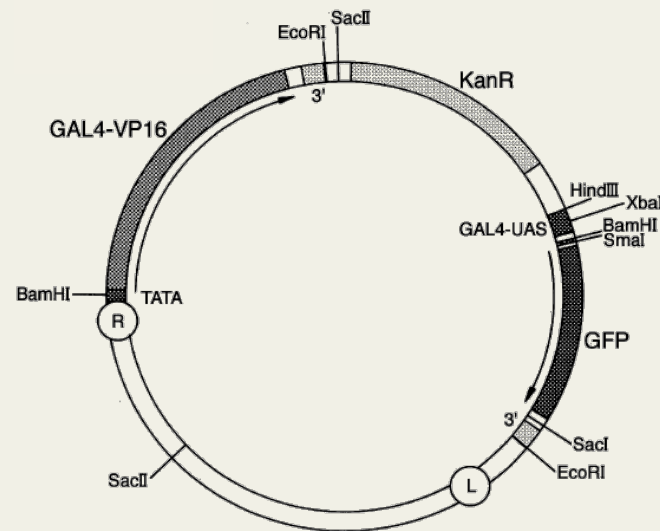


EXPRESSION CONDITIONNELLE GAL4- GFP ENHANCER TRAP SYSTEM



Technique

Jim Haseloff

Autres Travaux

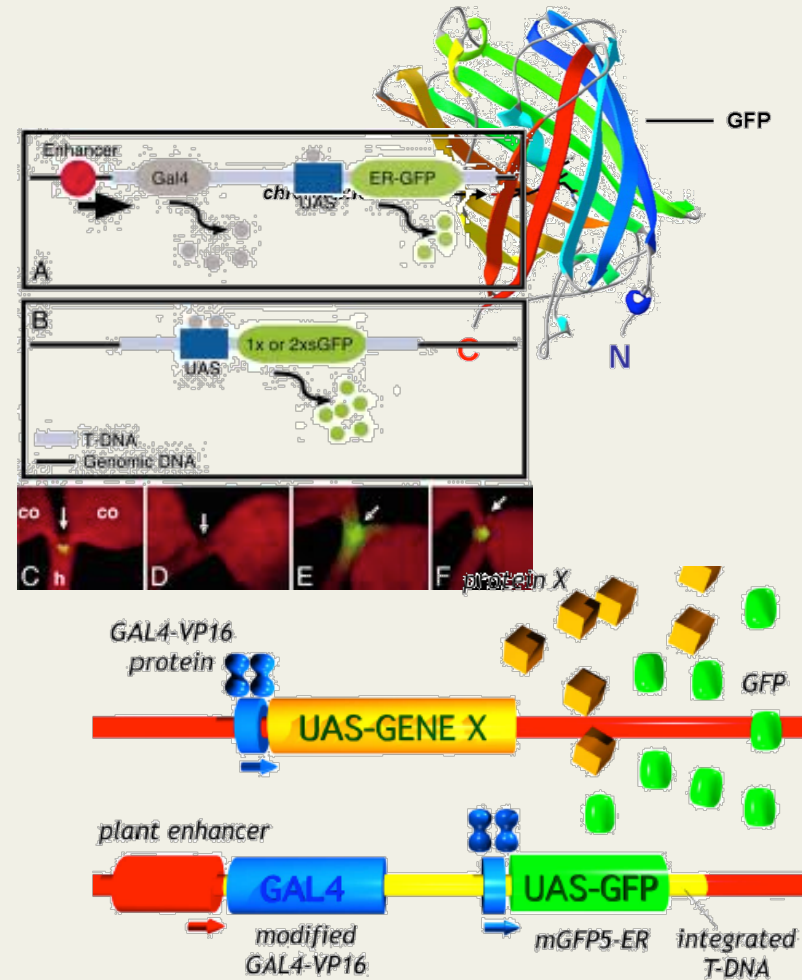
Avantages/Inconvénients

Alternatives

Définitions

Objectifs

Principe



Technique	Jim Haseloff	Autres Travaux	Avantages/Inconvénients	Alternatives
-----------	--------------	----------------	-------------------------	--------------

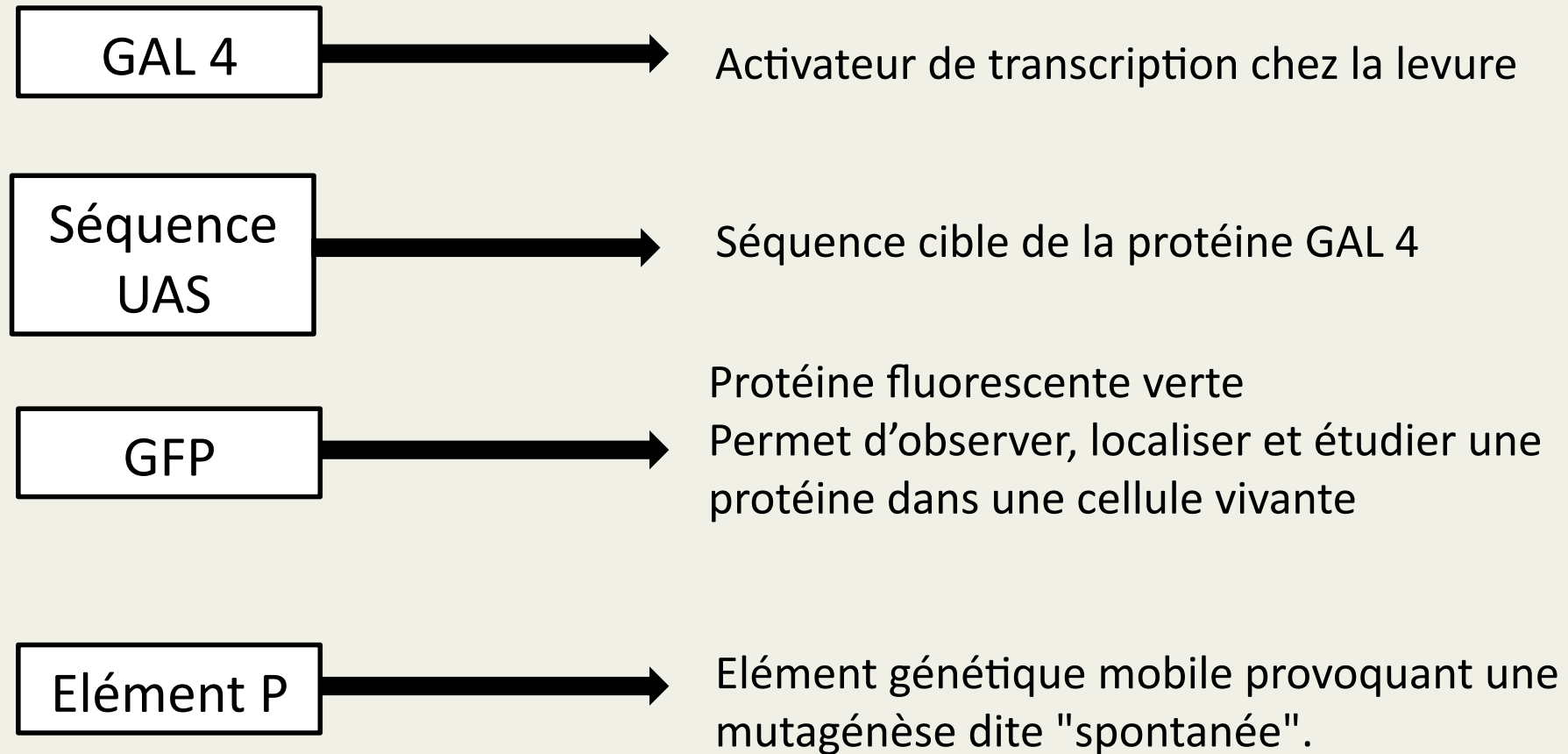
DÉFINITIONS

Expression conditionnelle → Expression génique sous conditions : selon la présence ou absence du gène rapporteur

Enhancer trap system → Séquence cis-régulatrice d'un gène, qui définit le plus souvent un profil d'expression spécifique suivant le tissu et le stade de développement.



DÉFINITIONS



Technique

Jim Haseloff

Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

OBJECTIFS

Marquer l'expression d'un gène

- Déterminer la localisation du gène
- Déterminer sa fonction au sein de l'organisme

Technique

Jim Haseloff

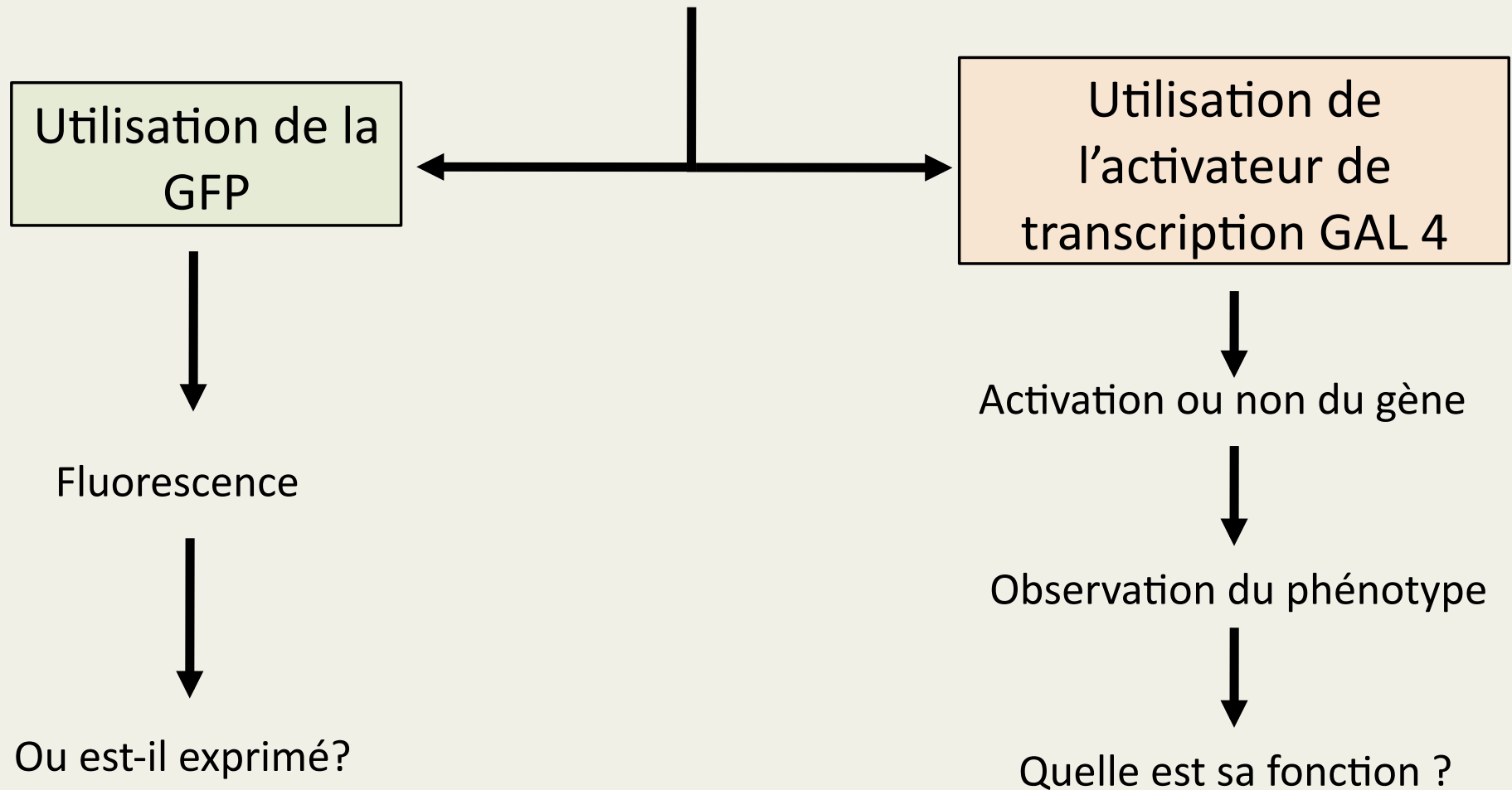
Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

PRINCIPE

Marquer l'expression d'un gène



Technique

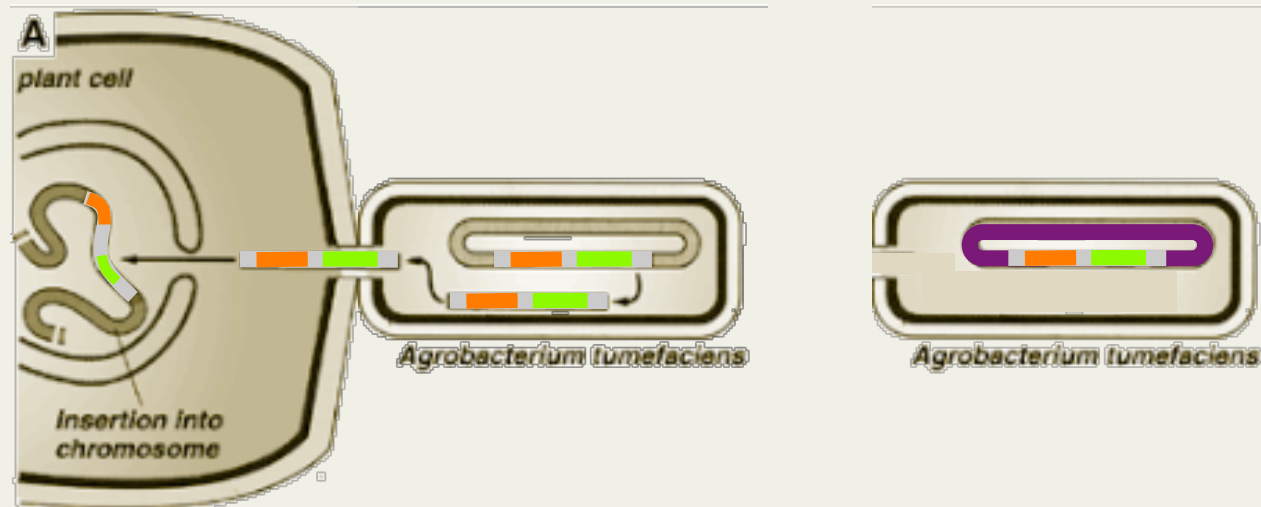
Jim Haseloff

Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

PRINCIPE



Technique

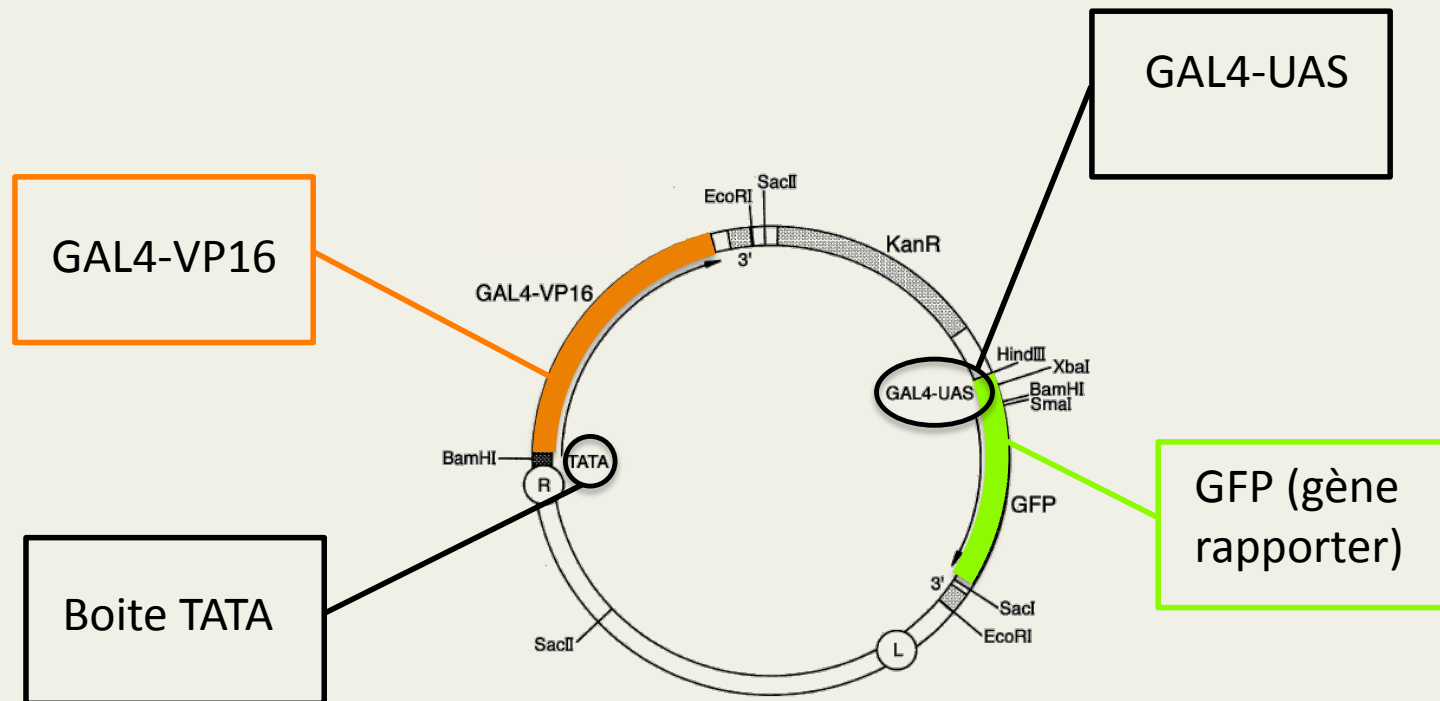
Jim Haseloff

Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

PRINCIPE



Technique

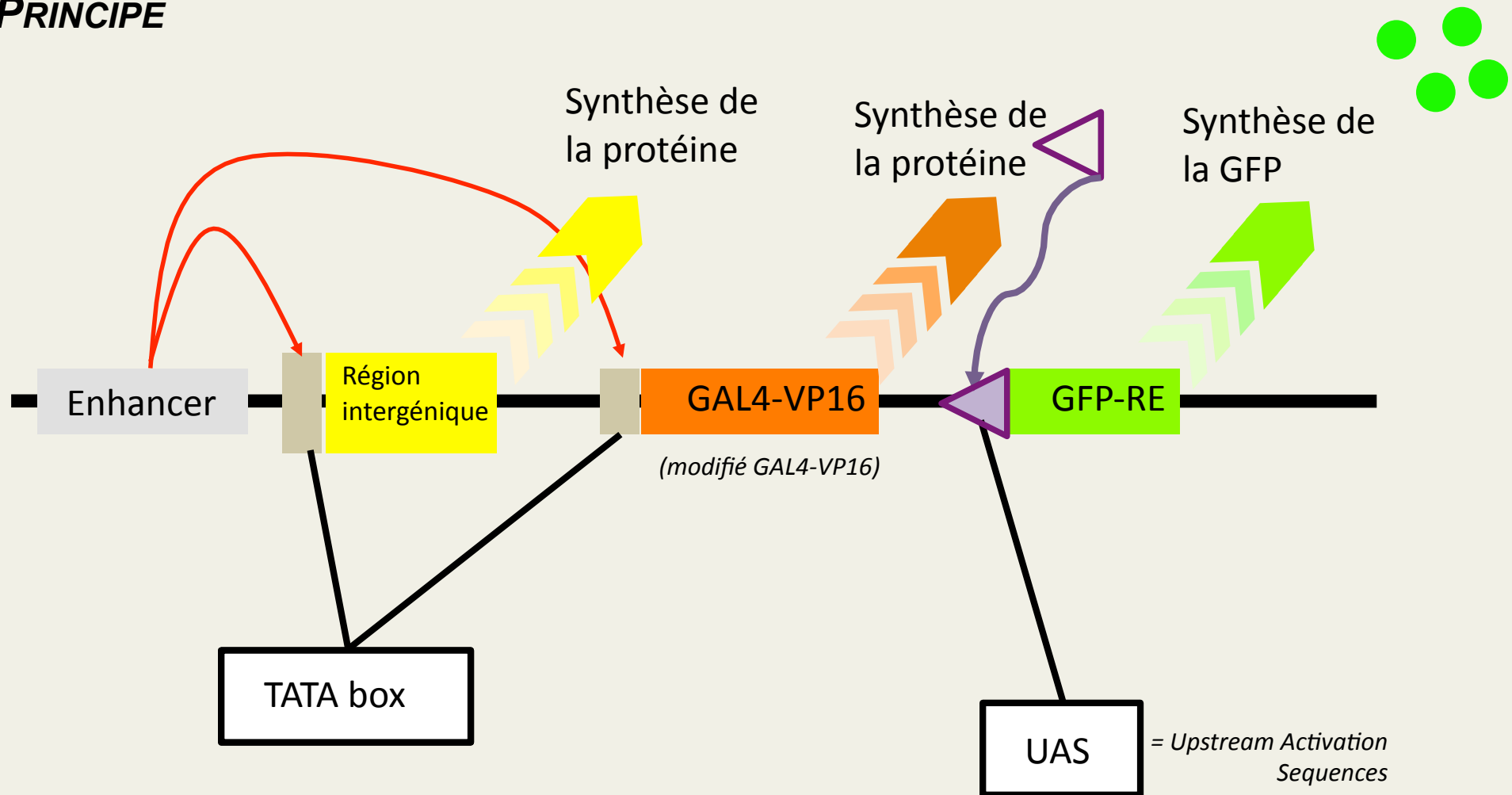
Jim Haseloff

Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

PRINCIPE



Technique

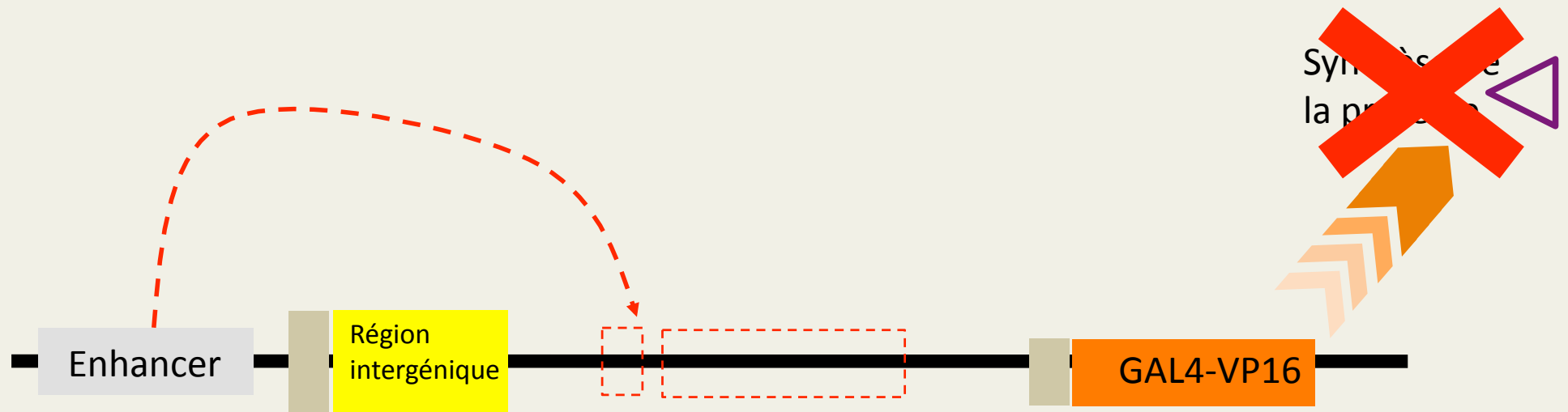
Jim Haseloff

Autres Travaux

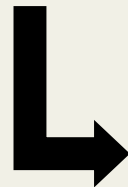
Avantages/Inconvénients

Alternatives

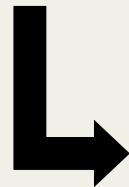
PRINCIPE



■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — **Alternatives** —



Présentation d'Haseloff Jim



*Utilisation de la méthode d'expression conditionnelle
Gal4 – GFP Enhancer trap system afin de comprendre les
mécanismes de développement des racines latérales
chez Arabidopsis thaliana*

Journal of Experimental Botany, Vol. 56, No. 419, pp. 2433–2442, September 2005
doi:10.1093/jxb/eri236 Advance Access publication 25 July, 2005
This paper is available online free of all access charges (see http://jxb.oup/journals.org/open_access.html for further details)



RESEARCH PAPER

**GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation
of lateral root development in *Arabidopsis thaliana***

Laurent Laplace^{1,2,*}, Boris Parizot³, Andrew Baker², Lilian Ricaud³, Alexandre Martinière¹, Florence Auguy¹,
Claudine Franche¹, Laurent Nussaume³, Didier Bogusz¹ and Jim Haseloff²

■ Technique — **Jim Haseloff** — Autres Travaux — Avantages/Inconvénients — Alternatives —

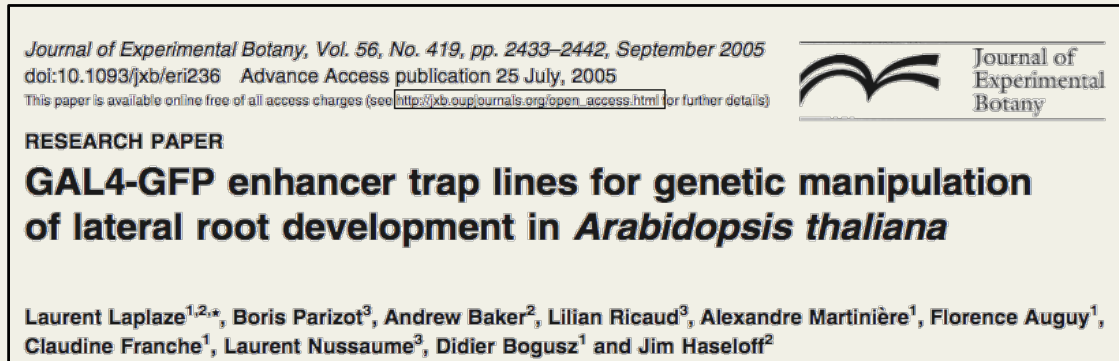
PRESENTATION DE JIM HASELOFF

- Intérêt pour l'étude de la **plasticité** au cours du développement et l'autonomie fonctionnelle des tissus végétaux, plus particulièrement pour comprendre les interactions locales cellules – cellules.
- Développement de méthodes pour suivre les cellules *in planta*.
- Premier à avoir utilisé l'expression conditionnelle Gal4 – GFP en biologie végétale.
- Sujet premier de recherche: Trouver de nouveaux outils pour analyser la morphogénèse des racines chez *Arabidopsis*.



Jim Haseloff
Department of Plant
Sciences
University of
Cambridge

■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — **Alternatives** —

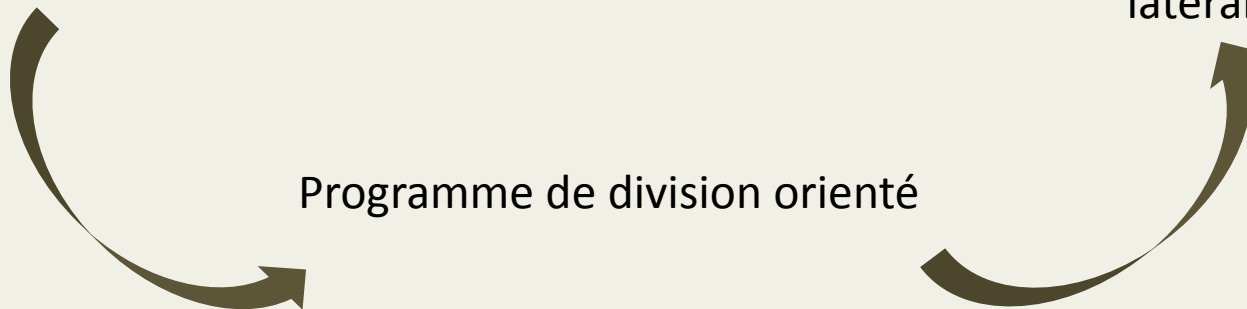


But : Comprendre les mécanismes de ramification de la racine

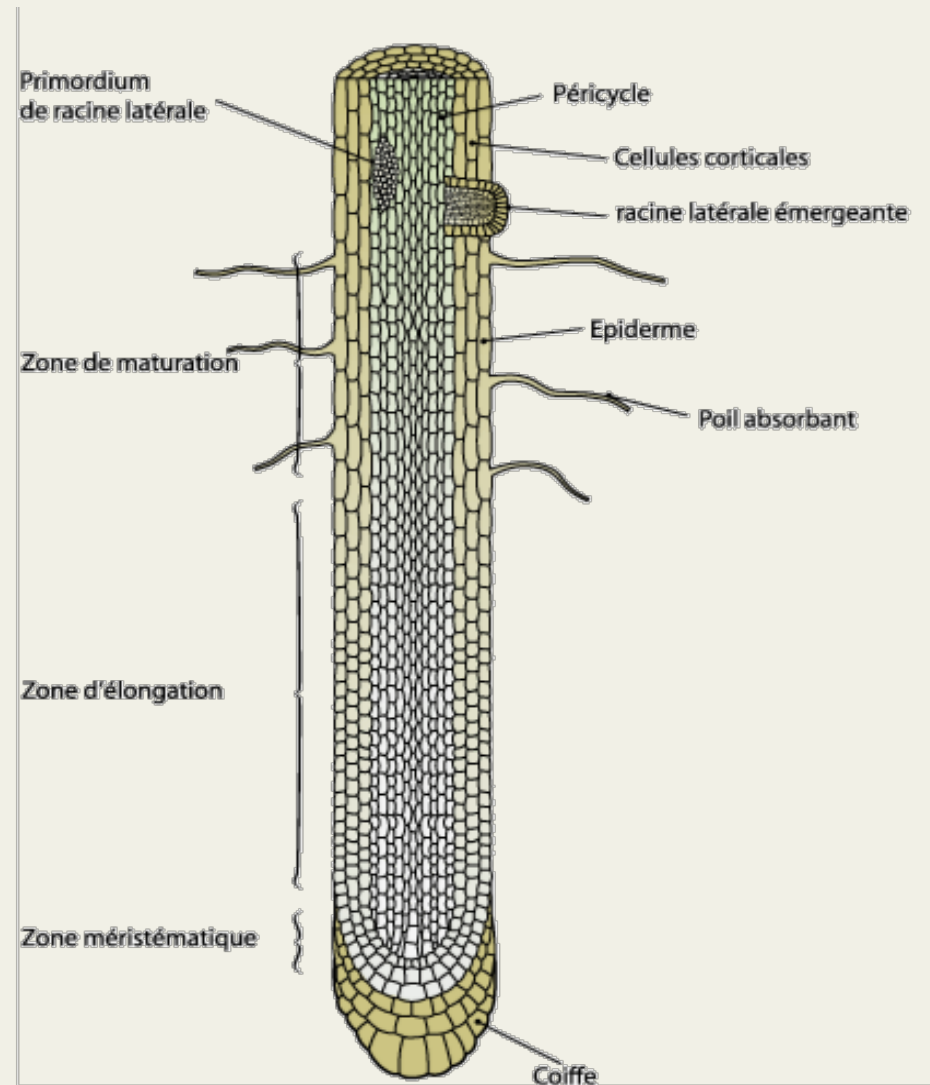
Cellules fondatrices du péricycle

Formation du primordium de la racine
latérale

Programme de division orienté



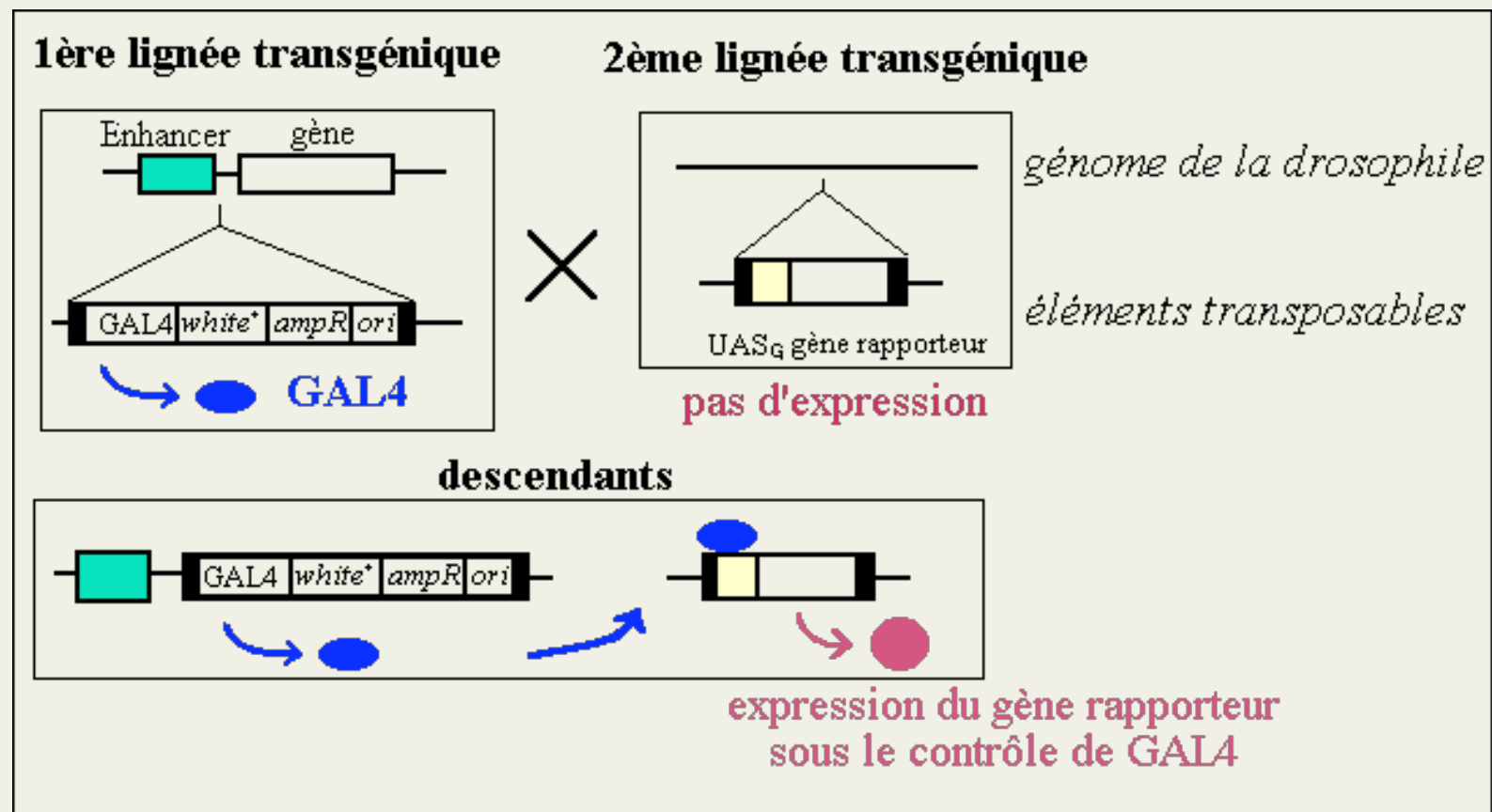
■ **Technique** ■ **Jim Haseloff** ■ **Autres Travaux** ■ **Avantages/Inconvénients** ■ **Alternatives** ■



■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — **Alternatives** —

Utilisation d'un système expérimental propre à l'étude du développement **chez la drosophile**

SYSTÈME GAL4/ UAS



■ Technique — *Jim Haseloff* — Autres Travaux — Avantages/Inconvénients — Alternatives —

*Particularité de la technique et intérêt
chez la drosophile :*

Tissu – spécifique
Cellules – spécifique

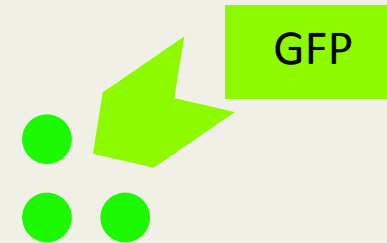
Système adapté
en 1999
par Jim Haseloff
chez A. Thaliana



Transformation de racines d'Arabidopsis Wild type



Collection de 401 GAL4-GFP enhancer trap



Plantes cultivées sur gélose verticale

Table 1. Lateral root enhancer trap lines

Line	No. of T-DNA insertions ^a	GFP expression pattern
JO121	1	Root xylem-pole pericycle cells
JO192	1	Lateral root primordia
J2712	1	Root cap, lateral root primordia, base of lateral roots
Q850	3	Root cap, lateral root primordia

^a The number of T-DNA insertions was studied by Southern blot hybridization using a *GAL4* probe.

Sélection de 4 lignées avec expression GFP dans les cellules fondatrices ou ébauches



Sélection des 2 lignées spécifiques au développement des racines latérales
JO121 et JO192

Technique

Jim Haseloff

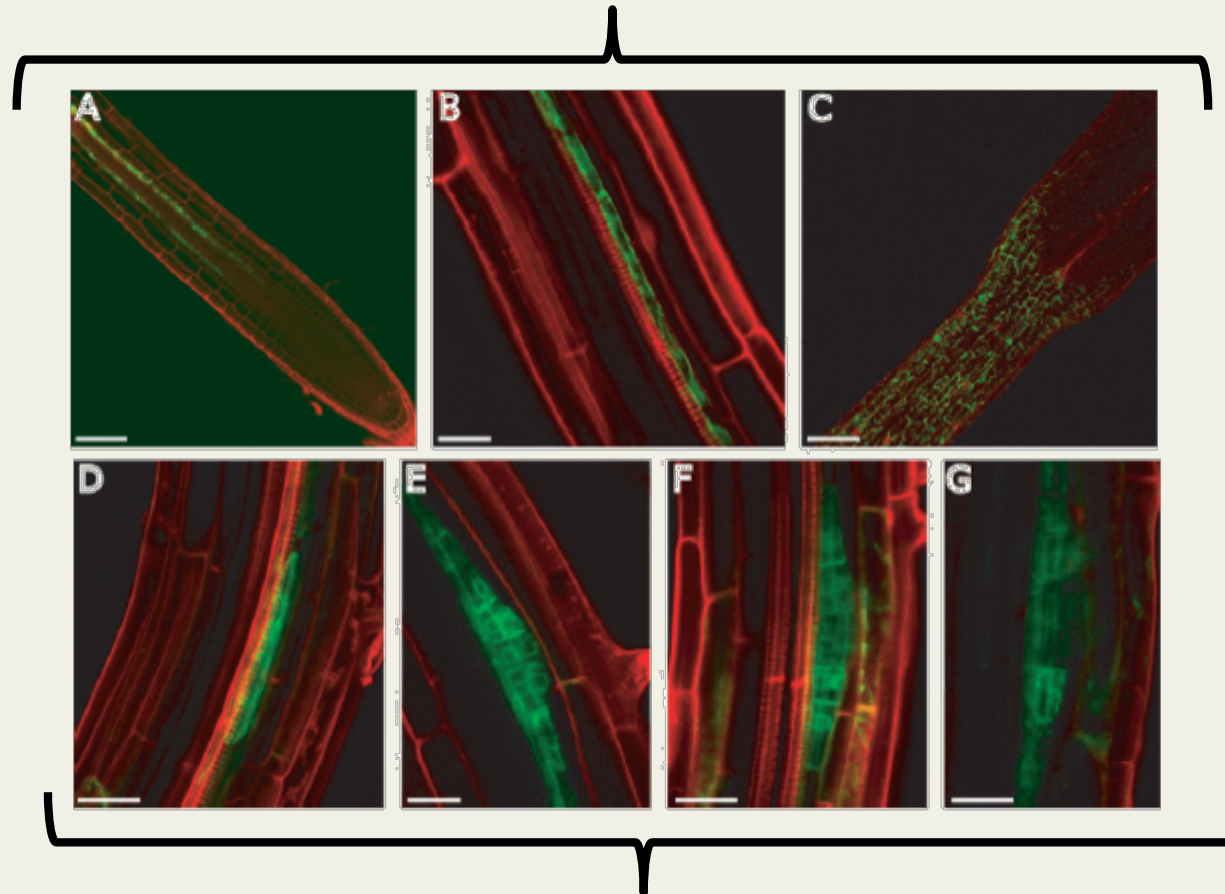
Autres Travaux

Avantages/Inconvénients

Alternatives

Etudes au cours du développement en microscopie confocale

JO121 : lignée spécifique aux cellules du péricycle

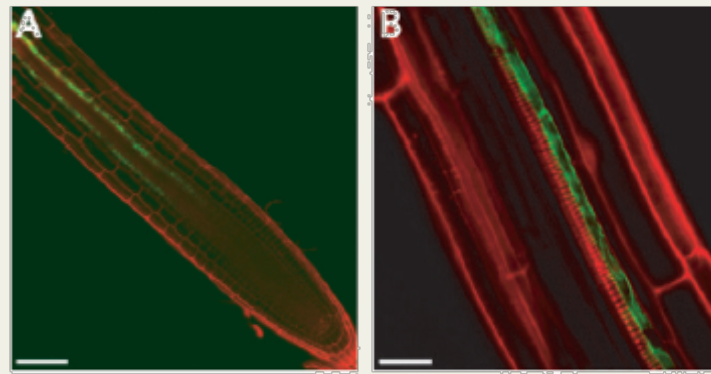


JO192: lignée spécifique au primordium de racines latérales

■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — **Alternatives** —

Etudes au cours du développement en microscopie confocale

JO121 : lignée spécifique aux cellules du péricycle

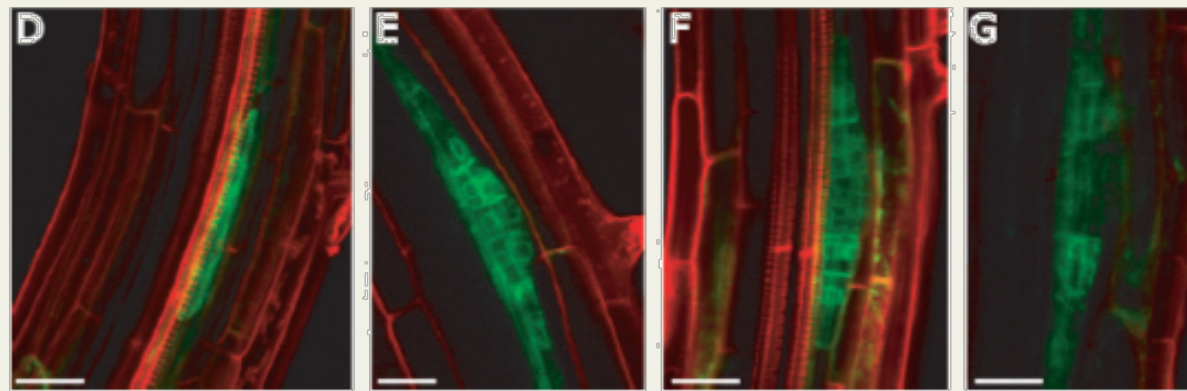


- Pas de fluorescence dans le méristème racinaire
- Expression GFP dans la zone d'élongation de la racine
- ➔ Expression limitée aux cellules du péricycle

■ **Technique** ■ **Jim Haseloff** ■ **Autres Travaux** ■ **Avantages/Inconvénients** ■ **Alternatives** ■

Etudes au cours du développement en microscopie confocale

JO192: lignée spécifique au primordium de racines latérales

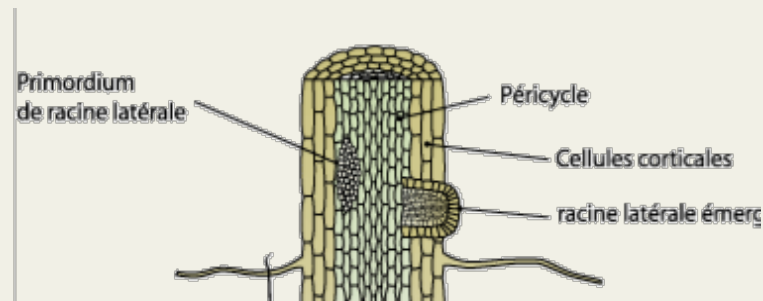


Stage I primordium

Stage II primordium

Stage III primordium

Stage V primordium



➔ Expression de la GFP varie au cours du temps et du développement
Observation d'une transition du péricycle vers les flancs de la racine

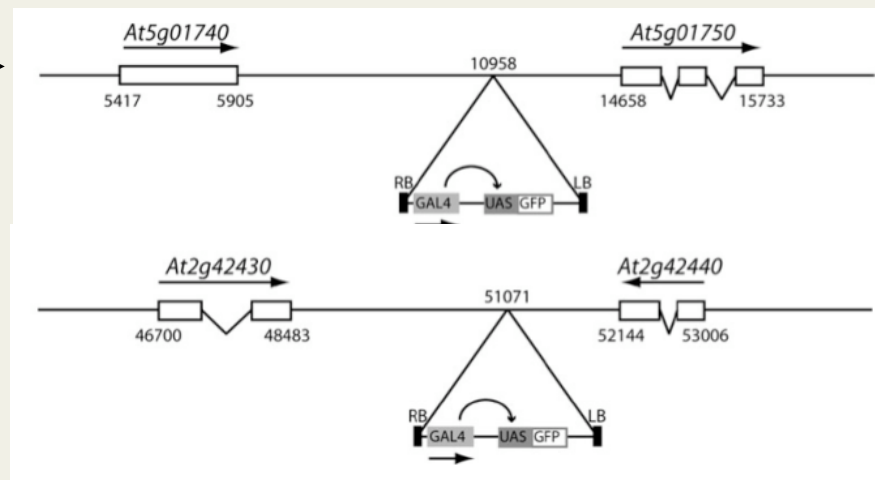
■ Technique — *Jim Haseloff* — Autres Travaux — Avantages/Inconvénients — Alternatives —

T-DNA inséré dans le génome de manière aléatoire

RT-PCR

détermination de la zone d'insertion

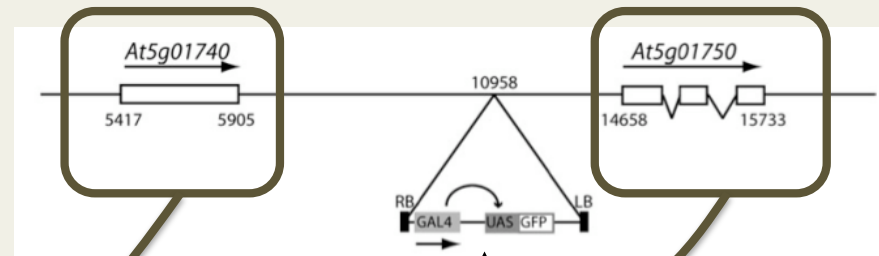
Lignée JO121



Lignée JO192

■ **Technique** ■ **Jim Haseloff** ■ **Autres Travaux** ■ **Avantages/Inconvénients** ■ **Alternatives** ■

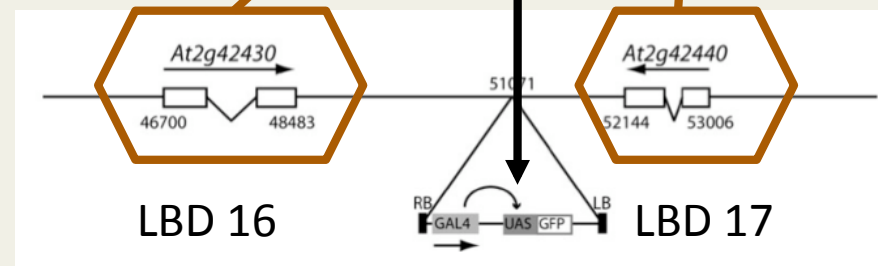
Régions
intergéniques
lignée JO121



T-DNA

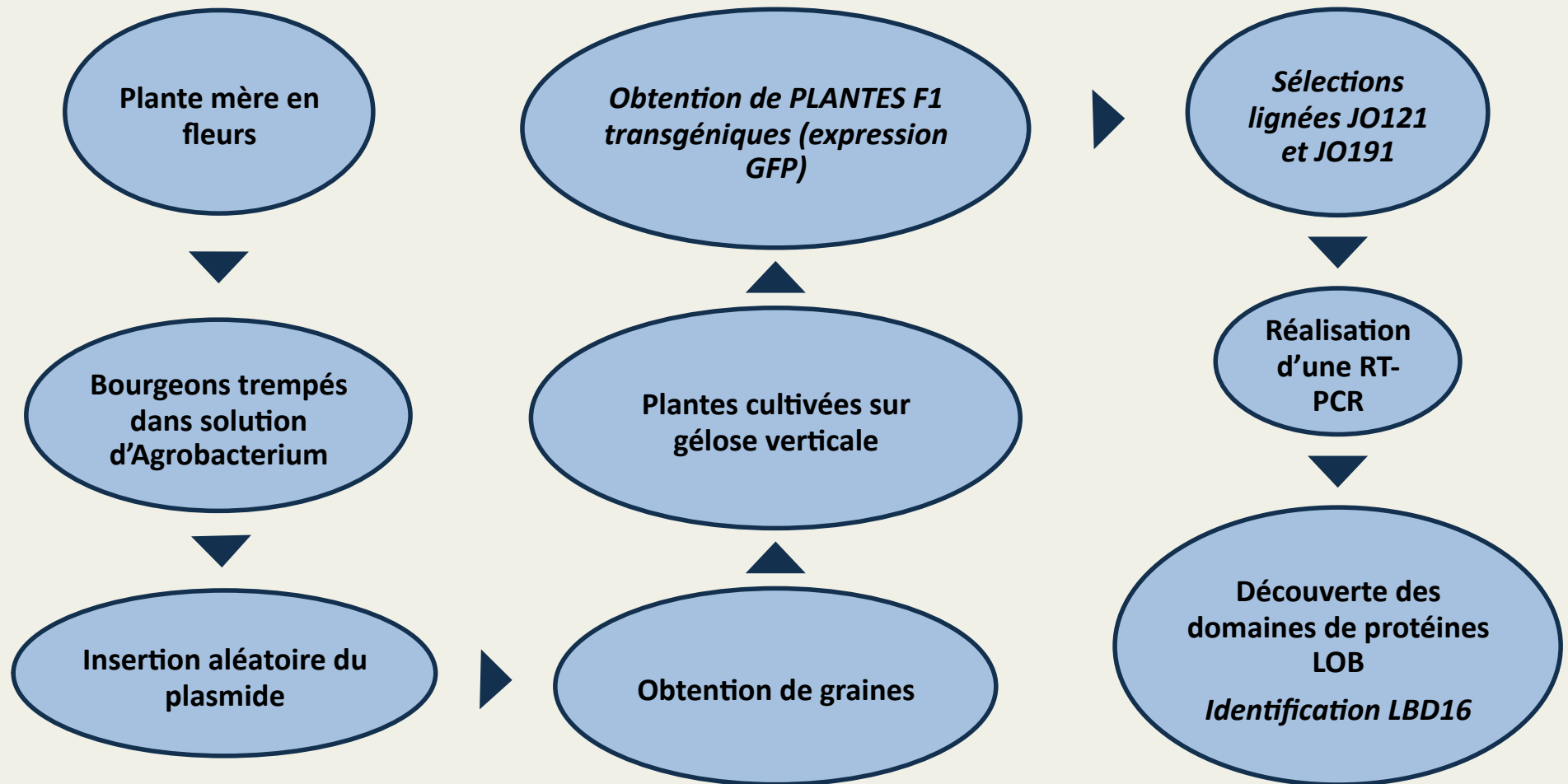
Régions
intergéniques
lignée JO192

T-DNA inséré dans
LOB-domain proteins



■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — **Alternatives** —

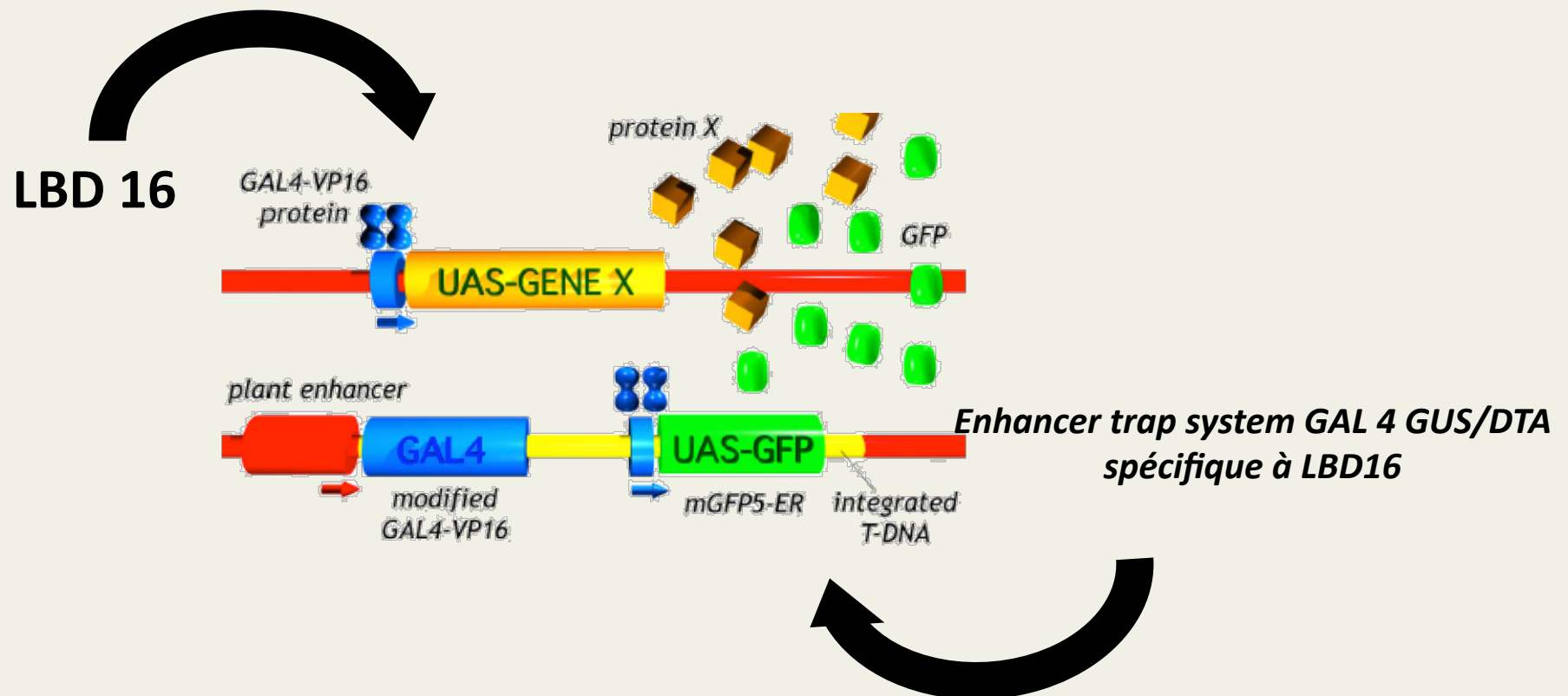
RECAPITULATIF



■ Technique — *Jim Haseloff* — Autres Travaux — Avantages/Inconvénients — Alternatives —

RECAPITULATIF

Croisements transgéniques



■ Technique — *Jim Haseloff* — Autres Travaux — Avantages/Inconvénients — Alternatives —

RECAPITULATIF

Transactivation de gènes et ablation génétique

GUS

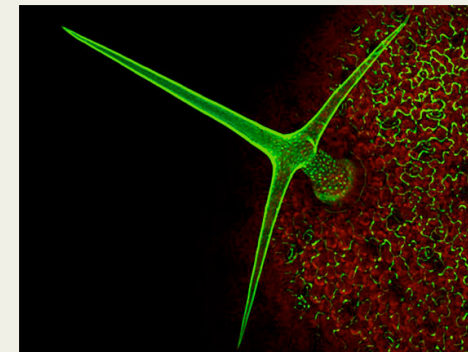
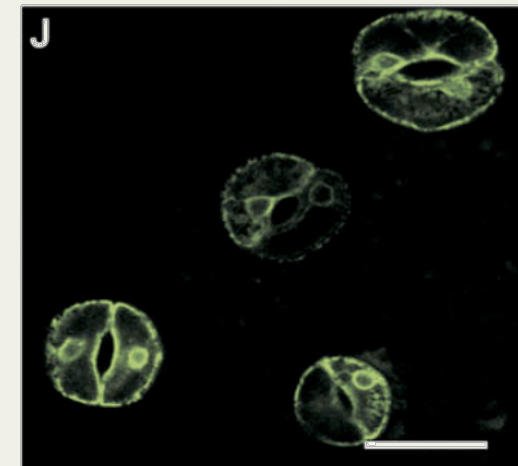
**Permet de comprendre où
se localise l'expression de
LBD16**

DTA

**Entraîne ablation génétique
des cellules cibles
Permet de comprendre la
fonction de LBD16**

■ **Technique** ■ **Jim Haseloff** ■ *Autres Travaux* ■ **Avantages/Inconvénients** ■ **Alternatives** ■

- Déterminer les gènes intervenant dans le développement des méristèmes racinaires
- Déterminer les gènes intervenant dans le développement des stomates
- Déterminer les gènes intervenant dans le développement des trichomes



■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — ***Avantages/Inconvénients*** — **Alternatives** —

Avantages

Observation sur matériel vivant

Permet de suivre évolution des tissus et ou organes spécifiques au cours du temps

Possibilité de générer un grand nombre de lignées transgéniques, chacune ayant un profil d'expression de GFP différent

Inconvénients

Implique de nombreux contrôles :

- modification structurale due à l'insertion du système
- stabilité de la GFP

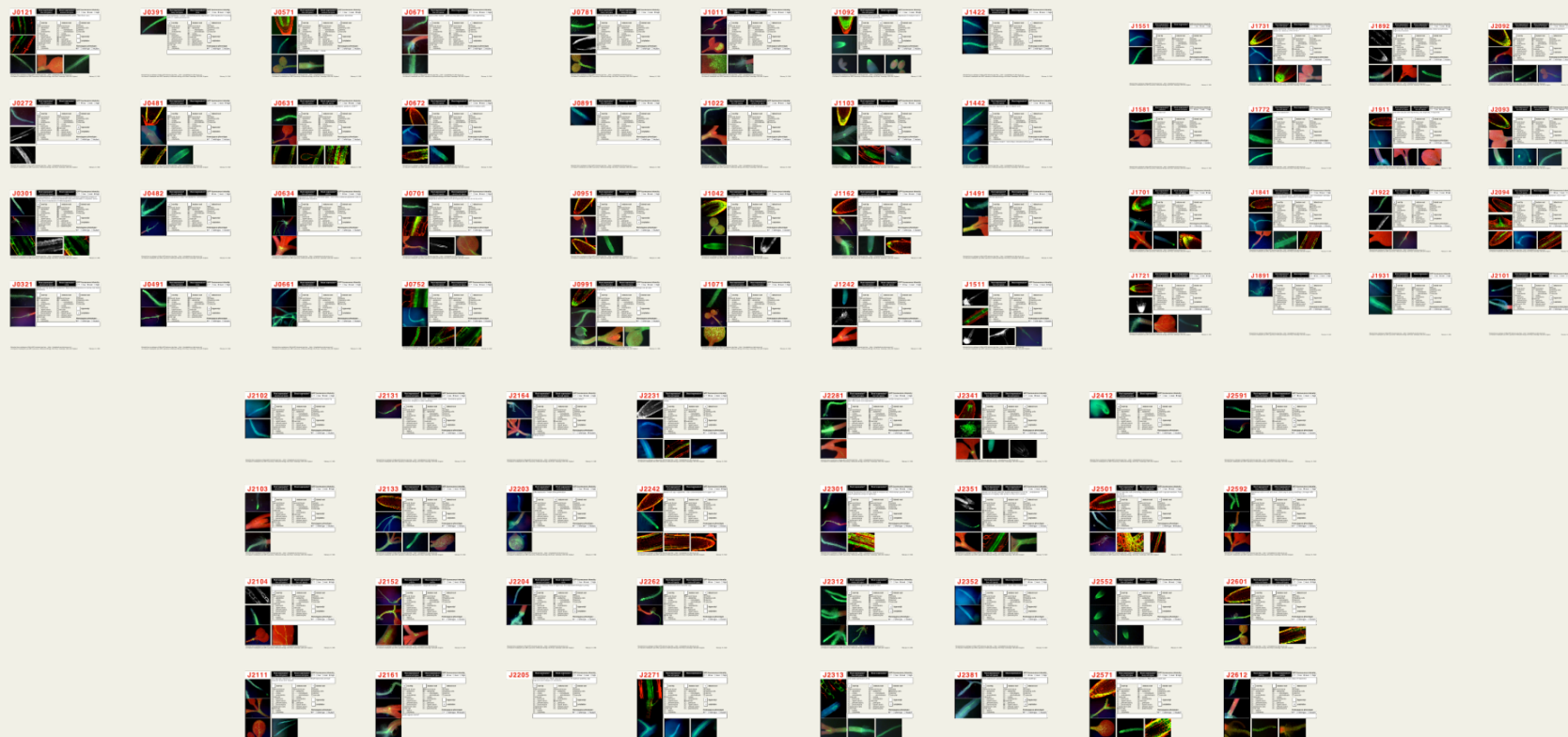
■ **Technique** — **Jim Haseloff** — **Autres Travaux** — **Avantages/Inconvénients** — *Alternatives* —

Avantages	Inconvénients
Observation sur matériel vivant	
Permet de suivre évolution des tissus et ou organes spécifiques au cours du temps	Implique de nombreux contrôles :
Possibilité de générer un grand nombre de lignées transgéniques, chacune ayant un profil d'expression de GFP différent	•modification structurale due à l'insertion du système •stabilité de la GFP

Alternatives	Gènes rapporteurs : •GUS •Luciférase Procédé : •Promoteurs inductibles
--------------	---

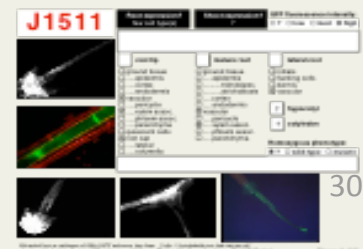
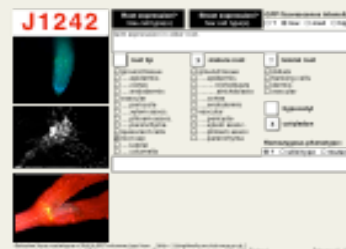
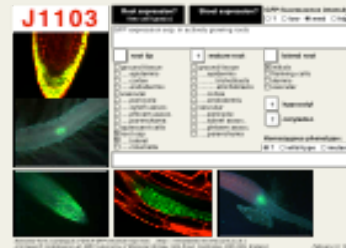
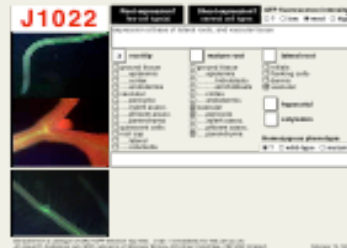
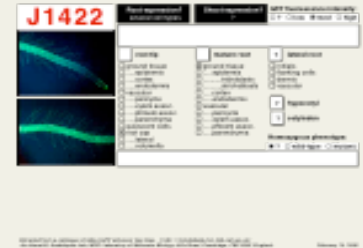
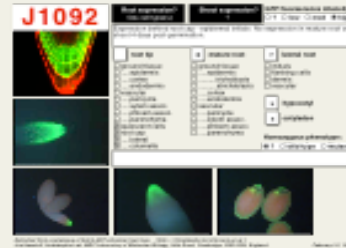
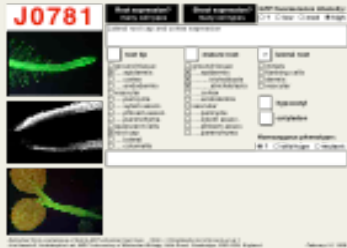
Conclusion

- Procédé intéressant
- Création d'une grande banque d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant la GFP dans divers tissus et à divers stade de développement



EXPRESSION CONDITIONNELLE Gal4-GFP enhancer trap system (Haseloff Jim)

Conclusion



Bibliographie

ARTICLES

1. **Laplaze L, Parizot B, Baker A, et al.** GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 2005;56(419):2433-2442.
2. **Haseloff J.** GFP variants for multispectral imaging of living cells. METHODS IN CELL BIOLOGY, VOL 58. 1999;58:139-+.
3. **Gardner M, Baker A, Assie J, et al.** GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 2009;60(1):213-226.
4. **Jia H, Van Loock B, Liao M, Verbelen J, Vissenberg K.** Combination of the ALCR/alcA ethanol switch and GAL4/VP16-UAS enhancer trap system enables spatial and temporal control of transgene expression in *Arabidopsis*. PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL. 2007;5(4):477-482.
5. **Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, et al.** Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. PLANT CELL. 2007;19(12):3889-3900.

SITES INTERNET

1. <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/assembly/page138/page138.html>
2. http://www.afd-ld.org/~fdp_bio/content.php?page=morpho_meristemes&skin=modiia